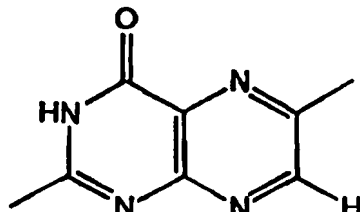
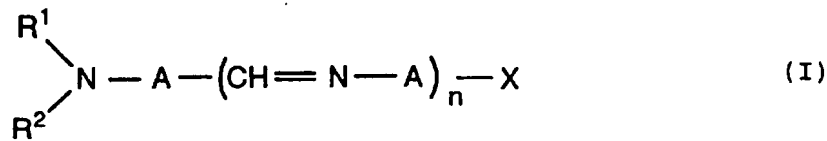




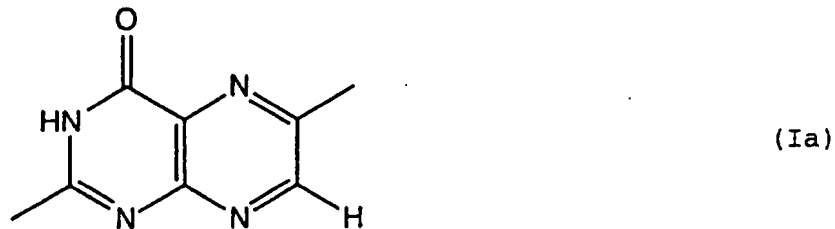
<p>(51) 国際特許分類6 C07D 475/00, A61K 30/505, 7/00, 7/48, A23K 1/30</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 <b>WO98/04558</b></p> <p>(43) 国際公開日 1998年2月5日(05.02.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02649</p> <p>(22) 国際出願日 1997年7月30日(30.07.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/218043 1996年7月31日(31.07.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 アルテミス(ARTEMIS, INC.)(JP/JP) 〒150 東京都渋谷区広尾三丁目15番2号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 荒井俊之(ARAI, Toshiyuki)(JP/JP) 〒606 京都府京都市左京区岡崎西福ノ川町26-46 Kyoto, (JP) 牧野圭祐(MAKINO, Keisuke)(JP/JP) 〒606 京都府京都市左京区上高野西明寺山33-24 Kyoto, (JP) 森健次郎(MORI, Kenjiro)(JP/JP) 〒606 京都府京都市左京区松ヶ崎三反長町10-1 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 森田憲一(MORITA, Kenichi) 〒173 東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央ビル5階 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AU, CA, CN, IL, IS, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: ACTIVE OXYGEN SCAVENGERS CONTAINING PTERIN DERIVATIVES</p> <p>(54)発明の名称 プテリン誘導体含有活性酸素消去剤</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Active oxygen scavengers containing as the active ingredient pterin derivatives represented by general formula (I) which are optionally cyclized or salts thereof, wherein R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> represent each hydrogen, C<sub>1-4</sub> alkyl or acyl represented by the general formula R<sup>3</sup>-CO- (wherein R<sup>3</sup> represents C<sub>1-4</sub> alkyl); X represents formyl or hydroxymethyl; A represents a group represented by formula (Ia), and n is 0 or an integer of 1 or above; provided that n is 0 when X is hydroxymethyl and that R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> are each hydrogen and X is formyl when n is an integer of 1 or above.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <math display="block">\begin{matrix} R^1 \\   \\ N-A-(CH=N-A)_n-X \\   \\ R^2 \end{matrix} \quad (I)</math> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(Ia)</p> </div> </div>		

(57) 要約

式 (I) :



[式中、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、水素原子、炭素数 1~4 のアルキル基、又は式 R<sup>3</sup> -CO- (R<sup>3</sup> は炭素数 1~4 のアルキル基である) で表されるアシル基であり、X は、ホルミル基又はヒドロキシメチル基であり、A は式 (I a) :



で表される基であり、n は 0 又は 1 以上の整数であるが、但し、X がヒドロキシメチル基である場合には、n は 0 であるものとし、n が 1 以上の整数である場合には、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は水素原子であり、X はホルミル基であるものとする] で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を有効成分として含有する活性酸素消去剤を開示する。

参考情報

PCT に基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載された PCT 加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BE	ベルギー	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TR	トルコ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	TV	ツバル
CA	カナダ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NE	ニジェール	US	米国
CG	コンゴ	JP	日本	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	KE	ケニア	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ共和国	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		
EE	エストニア						

## 明 細 書

## プテリン誘導体含有活性酸素消去剤

## 技術分野

本発明は、プテリン誘導体を含有する活性酸素消去剤に関する。また、本発明は、前記のプテリン誘導体を含有する医薬組成物又は化粧品組成物に関する。

## 背景技術

従来から、活性酸素が関与すると考えられている疾病が数多く知られている。こうした疾病の例としては、虚血障害（例えば、虚血性心疾患後遺症、脳梗塞後遺症、又はストレス潰瘍）、再カン流障害、炎症性疾患（例えば、慢性リュウマチ、腎炎、又は喘息）、癌、糖尿病、白内障、動脈硬化、薬物中毒、農薬中毒、薬物の過剰投与による肝障害、農薬の過剰摂取による肝障害、未熟児網膜症、光線過敏症、又は放射線障害などがある。

このような疾病の治療には、活性酸素消去作用を有する酵素、例えば、スーパーオキシドジスムターゼ（以下、SODと称することがある）の投与が有効とされている。しかし、SODは生体内半減期が極めて短いので、大量に投与することが必要である。また、酵素はタンパク質であるために、抗原性を有し、長期投与が必要な場合には抗原抗体反応によるアナフィラキシーショックなどの副作用を考慮する必要がある。更に、経口投与では効果が得られない等の種々の問題があった。

活性酸素に対して消去作用を有する非タンパク質化合物としては、プテリン誘導体が知られている。例えば、特開平6-56669号公報には、プテリン誘導体又はネオプテリン誘導体が活性酸素消去作用を有することが記載されている。また、特開平7-188232号公報には、前記と同様のプテリン誘導体又はネオプテリン誘導体が、フリーラジカルによる細胞障害に有効であることが記載されている。

前記のプテリン誘導体又はネオプテリン誘導体の代表的化合物であるネオプテ

リン〔すなわち、2-アミノ-4-オキソ-6-(D-エリスロ-1', 2', 3'-トリヒドロキシプロピル)-プテリジン：略称はNP〕は、マクロファージによって産生される物質であり、その生理的役割は現在のところ未だよく分かっていないが、活性酸素に対して抗酸化作用を有することは知られている〔例えば、S. Kojima等, FEBS, 304, 2, 3, 163-166, 1992; S. Kojima等, FEBS, 329, 1, 2, 125-128, 1993〕。

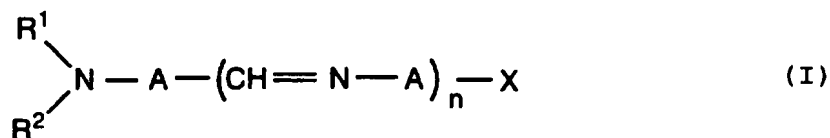
また、還元型ネオプテリンに相当する5, 6, 7, 8-テトラヒドロネオプテリン〔略称はNPH4〕が、強力な抗酸化作用を有することも知られており、各種の疾患に有効であることが報告されている〔例えば、S. Kojima等, FEBS, 304, 2, 3, 163-166, 1992; Ichio等, Biochemical Pharmacology, 45, 10, 1953-1958, 1993; Arai等, Neuroscience Letters, 173 (1994) 107-110〕。

しかしながら、前記の5, 6, 7, 8-テトラヒドロネオプテリン〔NPH4〕には催奇形性があるので、活性酸素消去作用を有する別異の非タンパク質化合物が求められていた。

本発明者は、活性酸素消去作用を有する非タンパク質化合物を鋭意探求した結果、従来、活性酸素消去作用を有することが全く知られていなかったプテリン誘導体が活性酸素消去作用を示すことを見出した。本発明は、こうした知見に基づくものである。

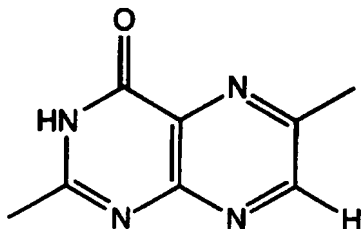
#### 発明の開示

前記の目的は、本発明による、式(I)：



〔式中、R<sup>1</sup> 及びR<sup>2</sup> は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～4のアルキル

基、又は式  $R^3 - CO -$  ( $R^3$  は炭素数 1~4 のアルキル基である) で表されるアシル基であり、X は、ホルミル基又はヒドロキシメチル基であり、A は式 (Ia) :



(Ia)

で表される基であり、n は 0 又は 1 以上の整数であるが、但し、X がヒドロキシメチル基である場合には n は 0 であるものとし、そして n が 1 以上の整数である場合には、 $R^1$  及び  $R^2$  はそれぞれ水素原子であり、X はホルミル基であるものとする] で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする、活性酸素消去剤によって達成することができる。

また、本発明は、前記式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又は薬剤学的に許容することのできるその塩を有効成分として含有することを特徴とする、医薬組成物にも関する。

更にまた、本発明は、前記式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を含有することを特徴とする、化粧品組成物にも関する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、PMN-PMA 系における 6-ホルミルプテリンの活性酸素消去活性を活性酸素の積算発光量によって示すグラフである。

図 2 は、DMSO 中の超酸化カリウム溶液に 6-ホルミルプテリンを加えた場合の低温電子スピン共鳴法で測定した結果を示すグラフである。

図 3 は、血流遮断を行っていない完全に正常な砂ネズミの脳海馬領域組織切片の顕微鏡写真である。

図 4 は、砂ネズミ一過性脳虚血モデルの対照群の脳海馬領域組織切片の顕微鏡写真である。

図5は、砂ネズミ一過性脳虚血モデルの6-ホルミルプテリン投与群の脳海馬領域組織切片の顕微鏡写真である。

発明を実施するための最良の形態

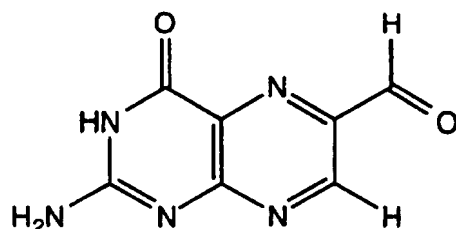
以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の活性酸素消去剤は、有効成分として前記式 (I) で表されるプテリン誘導体を含む。

$R^1$ 、 $R^2$ 、及び $R^3$  で表される炭素数1～4のアルキル基とは、直鎖又は分枝鎖の炭素数1～4のアルキル基であり、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*i*-ブチル基、*sec*-ブチル基、又は*tert*-ブチル基であり、メチル基又はエチル基が好ましい。前記式 (I) で表される化合物において、 $R^1$  及び $R^2$  は、それぞれ独立して、同一又は異なる、水素原子、前記の炭素数1～4のアルキル基、又は式 $R^3-CO-$  ( $R^3$  は前記の炭素数1～4のアルキル基である) で表されるアシル基であることができる。前記式 (I) において、*n*は、0又は1以上の整数、好ましくは0又は1～100の整数、より好ましくは0又は1～10の整数である。

前記式 (I) で表されるプテリン誘導体としては、 $R^1$  及び $R^2$  が、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～4のアルキル基、又は式 $R^3-CO-$ で表されるアシル基であり、 $R^3$  が炭素数1～4のアルキル基であり、Aが式 (I a) で表される基であり、*n*が0又は1以上の整数であり、Xがホルミル基である6-ホルミルプテリン誘導体が好ましい。

更に、前記式 (I) で表されるプテリン誘導体としては、 $R^1$  及び $R^2$  が水素原子であり、そして*n*が0である前記式 (I) で表される化合物、すなわち、式 (II) :



(II)

で表される6-ホルミル- $\epsilon$ -プテリンがより好ましい。

6-ホルミル- $\epsilon$ -プテリンは、アミノ基及びホルミル基を有するので、水溶液中で複数の分子間で Schiff 塩基を自然に形成し、6-ホルミル- $\epsilon$ -プテリンのオリゴマー又はポリマーとなることができる。このオリゴマー又はポリマーには、直鎖状のオリゴマー又はポリマーだけでなく、環状のオリゴマー又はポリマーも含まれる。単量体からオリゴマー又はポリマーへの反応は可逆反応であり、アルカリ条件下では、6-ホルミル- $\epsilon$ -プテリンオリゴマー又はポリマーは、単量体である6-ホルミル- $\epsilon$ -プテリンに容易に分解する。従って、生体内や皮膚上でも同様の可逆反応が行われるものと思われる。前記6-ホルミル- $\epsilon$ -プテリンオリゴマー又はポリマーは、 $R^1$  及び  $R^2$  が同時に水素原子であり、そして  $n$  が1以上（好ましくは1~100）の整数である前記式（I）で表される化合物であり、本発明の活性酸素消去剤における有効成分として使用することができる。

生体内で、前記式（I）で表されるプテリン誘導体に容易に変換することのできる誘導体、すなわち、プロドラッグも本発明の有効成分として使用することができる。適当なプロドラッグの選択及び製造に一般的に用いられる方法は、例えば、Design of Prodrugs, ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985に記載されている。

6-ホルミル- $\epsilon$ -プテリンは、遊離化合物の形で有効成分として使用できると共に、その塩、特に薬剤学的に許容することのできるその塩、例えば、無機酸塩（例えば、塩酸塩若しくは硫酸塩）又は有機酸塩（例えば、カンファースルホン酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、若しくはシュウ酸塩など）の形で使用することもできる。また、前記の6-ホルミル- $\epsilon$ -プテリンオリゴマー又はポリマーの形で使用することもできる。6-ホルミル- $\epsilon$ -プテリンオリゴマー又はポリマーは、公知化合物であり、それ自体公知の方法によって、遊離化合物をその塩へ、あるいはその塩を遊離化合物又は別の塩に変換することができる。

前記式（I）で表されるプテリン誘導体も、遊離化合物の形で有効成分として使用できると共に、その塩、特に薬剤学的に許容することのできるその塩、例えば、無機酸塩（例えば、塩酸塩若しくは硫酸塩）又は有機酸塩（例えば、カンファースルホン酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、若しくはシュウ酸塩など）

の形で使用することもできる。前記式 (I) で表されるプテリン誘導体は、公知化合物であり、それ自体公知の方法で調製することができる。また、それ自体公知の方法によって、遊離化合物をその塩へ、あるいはその塩を遊離化合物又は別の塩に変換することができる。

前記式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその薬剤学的に許容することのできる塩は、活性酸素消去作用を有するかあるいは活性酸素消去作用を有する化合物を誘導することができるので、本発明による医薬組成物の有効成分として用いることができる。

すなわち、前記式 (I) で表されるプテリン誘導体の内、 $n$  が 0 であり、そして  $R^1$  又は  $R^2$  のいずれかが水素原子でない式 (I) で表されるプテリン誘導体、又は 6-ホルミループテリン [すなわち、 $n$  が 0 であり、そして  $R^1$  及び  $R^2$  が同時に水素原子で有り、 $X$  がホルミル基である式 (I) で表される化合物] は、それ自体が、活性酸素を消去する作用を有するので、活性酸素生成系の種類を問わず、種々の原因で発生する活性酸素に対して広く有効である。

また、前記式 (I) で表されるプテリン誘導体の内、 $n$  が 1 以上の整数、特に  $n$  が 1 ~ 100 の整数である式 (I) で表されるプテリン誘導体は、投与した動物の体内又は体表で徐々に分解し、6-ホルミループテリンを放出するので、活性酸素生成系の種類を問わず、種々の原因で発生する活性酸素に対して広く有効である。

従って、本発明の医薬組成物は、活性酸素やラジカルが関与する種々の疾病、例えば、虚血障害 (例えば、虚血性心疾患後遺症、脳梗塞後遺症、又はストレス潰瘍)、再カン流障害、炎症性疾患 (例えば、慢性リュウマチ、腎炎、又は喘息)、癌、糖尿病、白内障、動脈硬化、薬物中毒、農薬中毒、薬物の過剰投与による肝障害、農薬の過剰摂取による肝障害、未熟児網膜症、光線過敏症、又は放射線障害などを効果的に治療又は予防することができる。

本発明による医薬組成物は、プテリン誘導体又は薬剤学的に許容することのできるその塩を、それ単独で、又は好ましくは薬剤学的若しくは獣医学的に許容することのできる通常の担体と共に、動物、好ましくは哺乳動物 (特に、ヒト) に投与することができる。



投与剤型としては、特に限定はなく、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エキス剤、若しくは丸剤などの経口剤、又は注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤、局所投与のクリーム、ゼリー、ジェル、ペースト、若しくは点眼薬などの非経口剤を挙げることができる。

これらの経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスターチ、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニト、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸、又は合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、矯味剤、安定化剤、保湿剤、防腐剤、又は酸化防止剤等を用いて、常法に従って製造することができる。例えば、6-ホルミルブテリンと乳糖とを混合して充填したカプセル剤などである。

非経口投与方法としては、クリーム又は軟膏等による局所投与、注射（皮下、静脈内等）、又は直腸投与等が例示される。これらのなかで、注射剤が最も好適に用いられる。

例えば、注射剤の調製においては、有効成分としてのブテリン誘導体の他に、例えば、生理食塩水若しくはリンゲル液等の水溶性溶剤、植物油若しくは脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖若しくは塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、又は乳化剤等を任意に用いることができる。

また、本発明の医薬組成物は、徐放性ポリマーなどを用いた徐放性製剤の手法を用いて投与してもよい。例えば、本発明の医薬組成物をエチレンビニル酢酸ポリマーのベレットに取り込ませて、このベレットを治療すべき組織中に外科的に移植することができる。

本発明の医薬組成物は、これに限定されるものではないが、ブテリン誘導体又は薬剤学的に許容することのできるその塩を、0.01～99重量%、好ましくは0.1～80重量%の量で含有することができる。

本発明の医薬組成物を、その活性酸素消去作用を利用して用いる場合の投与量

は、病気の種類、患者の年齢、性別、体重、症状の程度、又は投与方法などにより異なり、特に制限はないが、通常成人で6-ホルミル-プテリン量として0.1~100mg/kg体重を、1日1~4回程度にわけて経口的に又は非経口的に投与することができる。

前記式(I)で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその薬学的に許容することのできる塩は、活性酸素消去作用を有するかあるいは活性酸素消去作用を有する化合物を誘導することができるので、本発明による化粧品組成物の有効成分として用いることができる。皮膚は、生体の最外層にあるため、環境要因(特に、紫外線的作用)による活性酸素の影響を受ける。活性酸素の影響による皮膚疾患としては、例えば、炎症性皮膚疾患、膠原病、角化症、水疱症、又は光線過敏症を挙げることができる。皮膚の角質にはバリア機能があるので、化粧品などの外用剤の形で投与すると、有効成分が主に表皮でのみ作用し、例えば、表皮における脂質過酸化反応の抑制にかなり有用であることも知られている。従って、本発明の化粧品組成物は、紫外線的作用をはじめ、放射線、二酸化窒素又はタバコ煙などの関与により皮膚表面に発生することのある活性酸素を消去することにより、活性酸素による皮膚損傷を回避若しくは軽減、あるいは予防することができる。

本発明による化粧品組成物において、前記式(I)で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩の配合率は、特に限定されないが、0.01~99重量%、好ましくは0.1~80重量%の量で含有することができる。

本発明の化粧品組成物には、一般的に化粧品に使用される他の成分、例えば、油分、酸化防止剤、界面活性剤、保湿剤、香料、水、アルコール、増粘剤、防腐剤、防黴剤、色剤、粉末、及び/又は薬剤等を適宜配合することができる。また、これらとは別に、必要に応じて当業者に周知の紫外線吸収剤、例えば、安息香酸系紫外線吸収剤(例えば、パラアミノ安息香酸)、アントラニル酸系紫外線吸収剤(例えば、ホモメチル-N-アセチルアントラニレート)、サリチル酸系紫外線吸収剤(例えば、アミルサリシレート)、桂皮酸系紫外線吸収剤(例えば、オクタチルシンナメート)、及び/又はベンゾフェノン系紫外線吸収剤(例えば、2,4-ジヒドロキシベンゾフェノン)等を配合することもできる。

本発明の化粧品組成物は、溶液、乳化液、練り状混合物、固形物（プレス品）、粉末等任意の形態をとることが可能であり、日焼け化粧品、日焼け止め化粧品、化粧品下地、パック、化粧水、ファンデーション、クリーム、乳液、シャンプー、リンス、頭髮化粧品等として利用することができる。前記のように、活性酸素は強紫外線存在下で過剰に発生することがあるために、強紫外線存在下で使用する日焼け化粧品又は日焼け止め化粧品、例えば、サンオイル、サンローション、サンスクリーン、日焼け止めクリーム、日焼け止めローション、日焼け止め用ファンデーション、日焼け止め用化粧品下地、又は日焼け止め用ヘアートニック等にすることが好ましい。

6-ホルミループテリンについて、ラットを用いる急性毒性試験を行ったところ、静脈内注射により6 mg/kg体重量の6-ホルミループテリンを10匹のラットに投与し、3か月間観察したが、死亡例は認められなかった。

本発明による活性酸素消去剤の用途も医薬品や化粧品に限定されるものではなく、種々の用途、例えば、機能性食品や健康食品として飲食物の形で与えることも可能であり、更に飼料として非ヒト動物（特に飼育動物）に与えることができ、また臓器移植用の臓器を保存するための保存液中に添加剤として用いることもできる。

#### 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

#### 実施例1：6-ホルミループテリンの活性酸素消去活性の測定（PMN-PMA系）

健康成人より静脈血10mlを採血し、分離採取した好中球（polymorphonuclear leukocyte；略称はPMN）を約 $1 \times 10^6$ 細胞/mlになるようにHBSS（Hanks' balanced salt solution）に懸濁した。化学発光物質（すなわち、活性酸素の存在により化学発光を生じる化合物）である2-メチル-6-フェニル-3,7-ジヒドロイミダゾー（1,2- $\alpha$ ）-ピラジン-3-オン（以下、CLAと称する）を5

0  $\mu$ Mになるようにリン酸バッファー溶液（以下、PBSと称する）に溶解した。好中球を刺激することによって活性酸素を発生させる、いわゆる好中球刺激剤であるホルボルミリスチレートアセテート（phorbol myristate acetate；略称はPMA）を20  $\mu$ g/mlになるようにPBSに溶解した。こうして調製した好中球懸濁液、CLA溶液、及びPMA溶液は、測定に使用するまで氷冷保存した。

本発明の活性酸素消去剤の有効成分である6-ホルミループテリンを100  $\mu$ M、250  $\mu$ M、又は500  $\mu$ MになるようにPBSに溶解し、測定に使用する前に37℃に加温した。併せて、コントロールとして使用するPBSも測定に使用する前に37℃に加温した。

測定は、以下の手順で実施した。好中球懸濁液2 mlから遠心抽出した好中球に、各種濃度の6-ホルミループテリン溶液、又はPBSを加えて総容量を1930  $\mu$ lに調整し、試験管に入れて37℃で15分間加温した。CLA溶液50  $\mu$ lを添加した後、化学発光測定器にセットし、化学発光量の測定を開始した。測定開始から1分後に、PMA溶液20  $\mu$ lを注射器で試験管に注入した。測定は、温度37℃で10秒ごとに実施し、約10分間続けた。

結果を、図1に示す。図1のグラフは、10秒ごとの発光量を次々に積算した合計発光量を示す。曲線aは、コントロール、すなわち、6-ホルミループテリンの代わりにPBSのみを添加した場合の測定結果を示し、曲線bは、100  $\mu$ M 6-ホルミループテリンを添加した場合の測定結果を示し、曲線cは、250  $\mu$ M 6-ホルミループテリンを添加した場合の測定結果を示し、曲線dは、500  $\mu$ M 6-ホルミループテリンを添加した場合の測定結果を示す。6-ホルミループテリンの代わりにPBSのみを添加したコントロール（曲線a）に比べ、100  $\mu$ M 6-ホルミループテリンを添加した場合（曲線b）では、化学発光量、すなわち活性酸素量が大きく抑制され、更に、250  $\mu$ M又は500  $\mu$ M 6-ホルミループテリンを添加した場合（曲線c又は曲線d）では、化学発光量、すなわち活性酸素量がほぼ消失した。

実施例2：6-ホルミループテリンの活性酸素消去活性の測定（超酸化カリウム由来）

ジメチルスルホキシド (DMSO) 20 ml 中に超酸化カリウム ( $\text{KO}_2$ ) 28 mg を添加して飽和溶液を調製し、DMSO 中で活性酸素を発生させた。ここで、標準物質として 2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-N-オキシド (TEMPO) を使用し、これを DMSO に加え、0.1、0.3、0.5、0.7、1、1.2、又は 1.5 mM 溶液として用いた。得られた電子スピン共鳴シグナル (77 K で測定) を積分し、検量線を作成した。この検量線により、DMSO 中の活性酸素の濃度を測定したところ、約 0.5 mM であった。

本発明の活性酸素消去剤の有効成分である 6-ホルミループテリンを 10 mM になるように DMSO に溶解した。前記の  $\text{KO}_2$  溶液に 6-ホルミループテリンを加えない場合の活性酸素発生量 (コントロール)、及び前記の  $\text{KO}_2$  溶液に所定濃度の 6-ホルミループテリンを加えた場合の活性酸素発生量を、低温 (77 K) 電子スピン共鳴法により測定した。

測定結果を図 2 に示す。6-ホルミループテリンの DMSO 中の最終濃度を 0.001 mM から 1 mM まで 10 倍ずつ上げていった場合の  $\text{KO}_2$  からの活性酸素発生量は、矢印 A で示す位置、すなわち、328 mT の位置に表れるピーク (微分型) を 2 回積分して求めた値の大きさから求めることができる。曲線 a はコントロール、すなわち、6-ホルミループテリンを加えない場合の測定結果を示し、曲線 b~e は、0.001 mM、0.01 mM、0.1 mM、及び 1 mM 6-ホルミループテリンを添加した場合のそれぞれの測定結果を示す。

$\text{KO}_2$  溶液に 6-ホルミループテリンを加えない場合に比べて、 $\text{KO}_2$  溶液に 6-ホルミループテリンを加えた場合には、6-ホルミループテリン濃度が 0.1 mM になると、 $\text{KO}_2$  からの活性酸素発生量が低下し、6-ホルミループテリン濃度が 1 mM になると、 $\text{KO}_2$  からの活性酸素発生量がほぼ消失した。

先に確認したように、DMSO 20 ml に  $\text{KO}_2$  28 mg を加えた系から発生する活性酸素量は、約 0.5 mM であることから、6-ホルミループテリンが、 $\text{KO}_2$  から発生する活性酸素を約 1 : 1 の割合で消去したと考えられる。

#### 実施例 3 : ヒドロキシメチル体の活性酸素消去活性の測定 (超酸化カリウム由来)

0.001 mM ~ 1 mM の 6-ホルミループテリンに替えて、0.01 mM ~ 10 mM の 6-ヒドロキシメチループテリン [前記式 (I) において、 $\text{R}^1$  及び

R<sup>2</sup> が水素原子であり、Xがヒドロキシメチル基であり、nが0である化合物〕を使用すること以外は、前記実施例2に記載の操作を繰り返すことによって、6-ヒドロキシメチループテリンの活性酸素消去活性を測定したところ、6-ホルミループテリンと同様の活性酸素消去活性が、6-ホルミループテリンの10倍濃度の6-ヒドロキシメチループテリンにおいて観察された。

#### 実施例4：活性酸素消去作用による遅発性神経細胞死の抑制

全身麻酔した砂ネズミ（体重＝約80g）の頸部を切開し、直視下で両側頸動脈をクリップで結紮することにより血流を遮断した。5分後に血流を再開させ、創部を縫合した。血流の再開から30分経過後に、対照群には生理食塩水1mlを腹腔内投与し、薬物投与群には50mM6-ホルミループテリン（生理食塩水内）1mlを腹腔内投与し、その後麻酔から覚まして、1週間飼育した。1週間後、前記の砂ネズミを全身麻酔して脳を摘出し、組織切片を作成し、神経細胞を特異的に描出する微小管結合タンパク質2(microtubule-associated protein 2; MAP2)染色を施すことにより、脳海馬領域の遅発性神経細胞死(delayed neuronal death; DND)の程度を評価した。

図3～図5に前記砂ネズミの脳海馬領域の組織切片の顕微鏡写真を示す。図3は血流遮断を行っていない完全に正常な組織状態の組織切片写真であり、図4は対照群の組織切片写真であり、そして図5は6-ホルミループテリン投与群の組織切片写真である。また、図3(1)、図4(1)及び図5(1)は、それぞれ約60倍の拡大写真であり、図3(2)、図4(2)及び図5(2)は、それぞれ約600倍の拡大写真である。

図4では、神経細胞が完全に脱落した状態を示しており、図5では、多くの神経細胞が生存している状態を示している。

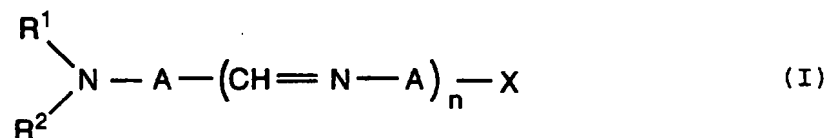
前記の結果は、6-ホルミループテリンはその活性酸素消去作用により、砂ネズミ一過性脳虚血モデルにおいて遅発性神経細胞死が抑制されることを示している。

産業上の利用可能性

本発明の活性酸素消去剤は、種々の原因で発生する活性酸素に対して広く有効である。従って、前記の活性酸素消去剤を含有する本発明の医薬組成物は、活性酸素が関与するものと考えられる各種の疾病を効果的に治療することができるものと期待される。また、前記の活性酸素消去剤を含有する本発明の化粧品組成物は、紫外線などの作用によって発生する活性酸素による悪影響を軽減ないし回避することが期待される。

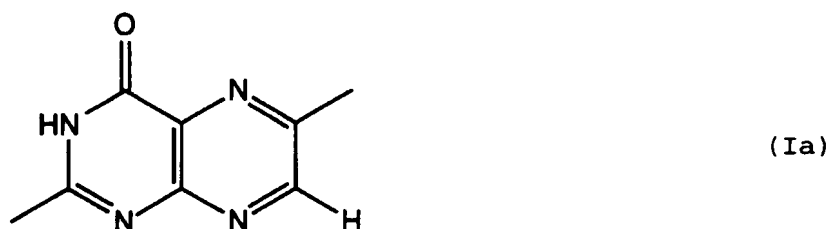
## 請求の範囲

1. 式 (I) :



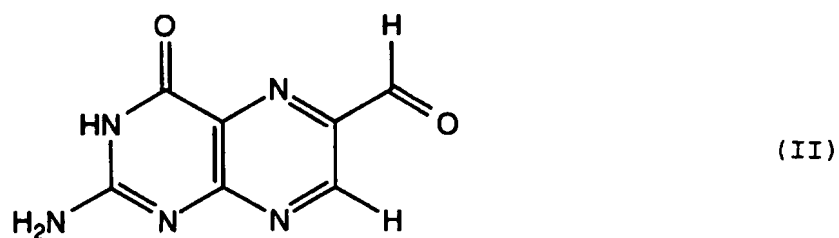
〔式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数 1～4 のアルキル基、又は式  $R^3 - CO -$  ( $R^3$  は炭素数 1～4 のアルキル基である) で表されるアシル基であり、 $X$  は、ホルミル基又はヒドロキシメチル基であり、 $A$  は式

(I a) :



で表される基であり、 $n$  は 0 又は 1 以上の整数であるが、但し、 $X$  がヒドロキシメチル基である場合には  $n$  は 0 であるものとし、そして  $n$  が 1 以上の整数である場合には、 $R^1$  及び  $R^2$  はそれぞれ水素原子であり、 $X$  はホルミル基であるものとする〕で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする、活性酸素消去剤。

2. 式 (II) :



で表される 6-ホルミルプテリン又はその塩を有効成分として含有する、請求



項 1 に記載の活性酸素消去剤。

3. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又は薬剤学的に許容することのできるその塩を有効成分として含有することを特徴とする、医薬組成物。

4. 活性酸素が関与する疾病の予防又は治療用である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

5. 活性酸素が関与する疾病が、虚血障害、再カン流障害、炎症性疾患、癌、糖尿病、白内障、動脈硬化、薬物中毒、農薬中毒、薬物の過剰投与による肝障害、農薬の過剰摂取による肝障害、未熟児網膜症、光線過敏症、又は放射線障害である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

6. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を含有することを特徴とする、化粧品組成物。

7. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を含有することを特徴とする、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療用の機能性食品。

8. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を含有することを特徴とする、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療用の飼料。

9. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を含有することを特徴とする、臓器保存液用添加剤。

10. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療に有効な量で、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療が必要な対象に投与することを含む、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療方法。

11. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩の、医薬組成物製造への使用。

FIG. 1

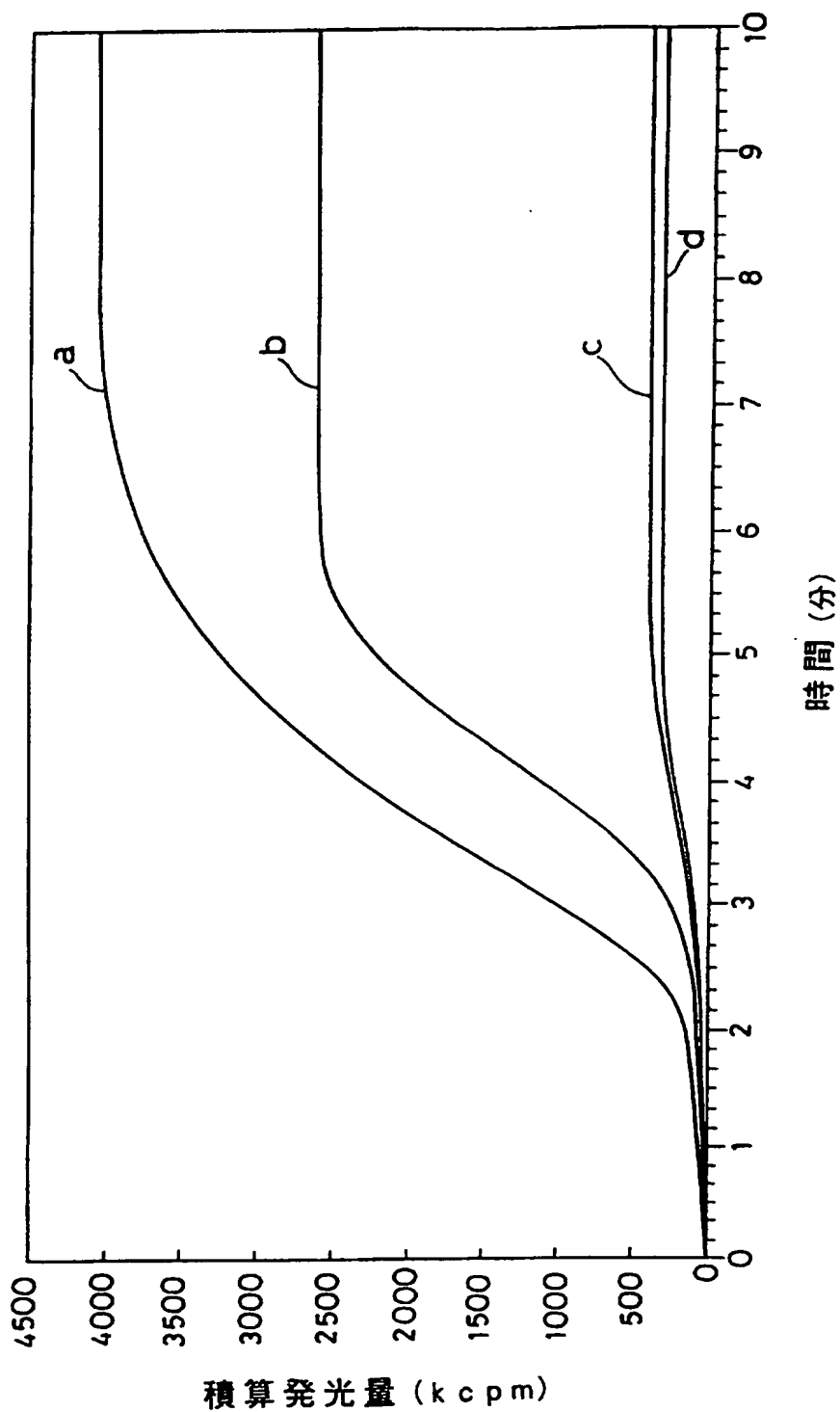
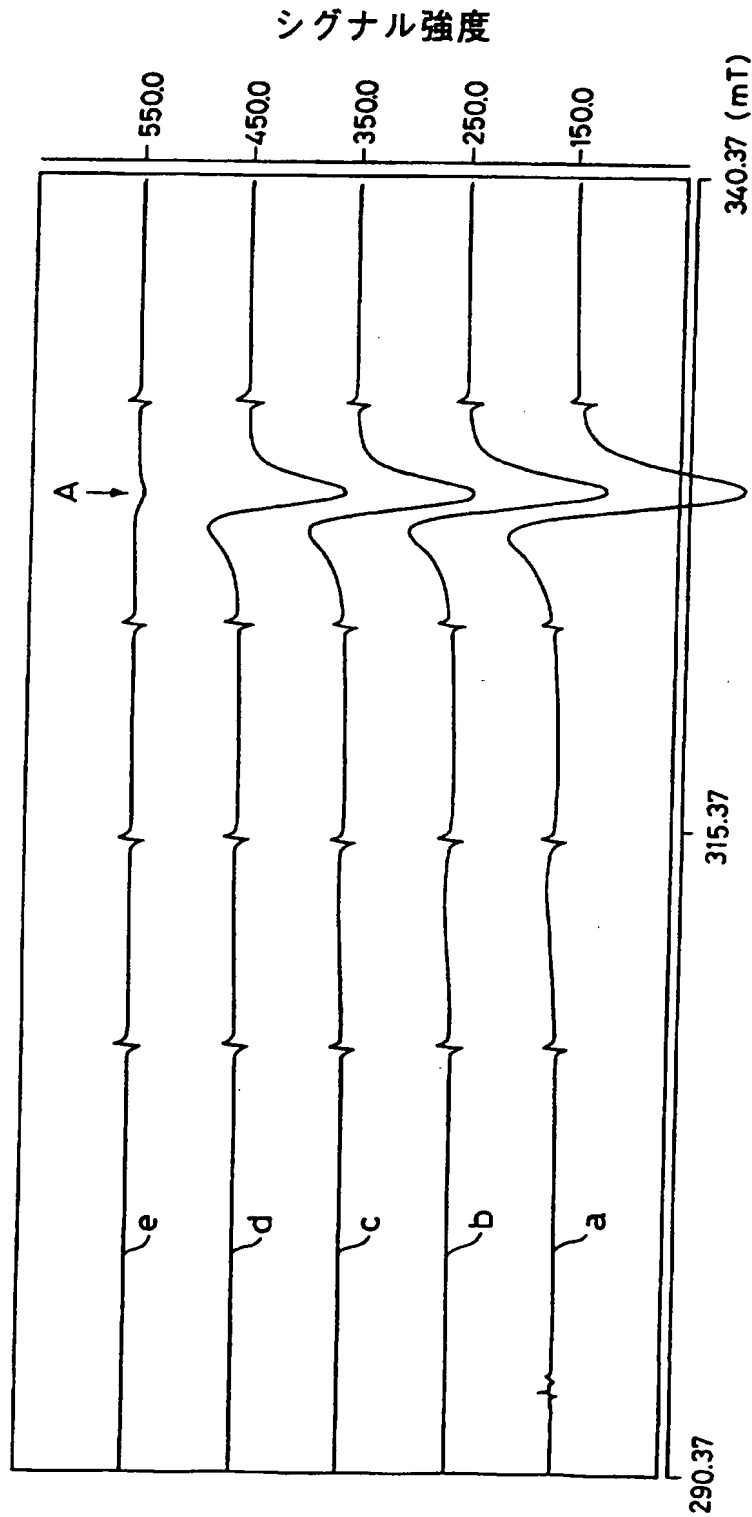


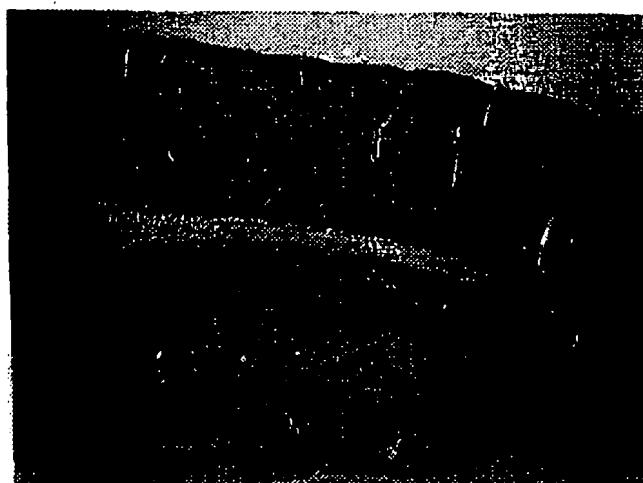
FIG. 2



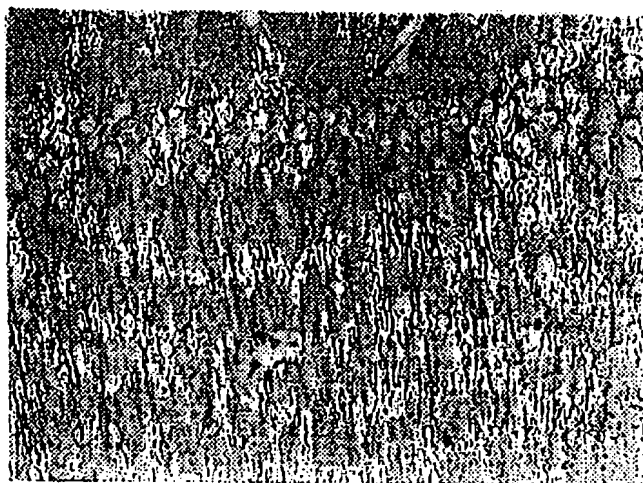
3 / 5

FIG. 3

(1)



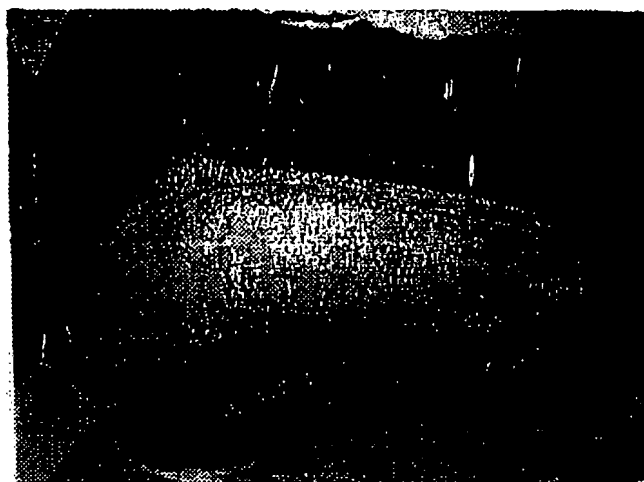
(2)



4 / 5

FIG. 4

(1)



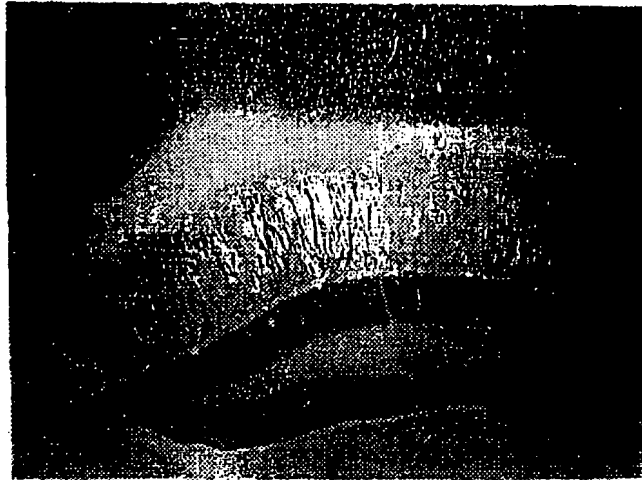
(2)



5 / 5

FIG. 5

(1)



(2)



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP97/02649

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int. Cl <sup>6</sup> C07D475/00, A61K30/505, 7/00, 7/48, A23K1/30		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl <sup>6</sup> C07D475/00, A61K30/505, 7/00, 7/48, A23K1/30		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CA (STN), REG (STN), WPI/L (QUESTEL)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 6-56669, A (Asahi Breweries, Ltd.), March 1, 1994 (01. 03. 94)	1-5, 7, 11
A	(Family: none)	6, 8-9
A	FEBS Lett. Vol. 321, No. 1, pp. 89-92, 1993 Gunter Weiss et al. "Neopterin modulates toxicity Mediated by reactive oxygen and Chloride species."	1-9, 11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
October 24, 1997 (24. 10. 97)		November 5, 1997 (05. 11. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02649

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 10  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 10 pertains to methods for prevention or treatment of diseases in which active oxygen participates by administering optionally cyclized pterin derivatives or salts thereof to subjects requiring prevention or treatment of diseases in which active oxygen participates and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C07D475/00, A61K30/505, 7/00, 7/48, A23K1/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C07D475/00, A61K30/505, 7/00, 7/48, A23K1/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA (STN), REG (STN), WPI/L (QUESTEL)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 6-56669, A (アサヒビール株式会社) 1. 3月. 1994 (01. 03. 94)	1-5, 7, 11
A	(ファミリーなし)	6, 8-9
A	FEBS Lett. Vol. 321, No. 1, pp. 89-92, 1993. Gunter Weiss et al. "Neopterin modulates toxicity Mediated by reactive oxygen and Chloride species."	1-9, 11

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
24. 10. 97

国際調査報告の発送日  
05.11.97

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
富士 美香  
電話番号 03-3581-1101 内線 6853



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 10 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲10は、プテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療に必要な対象に投与することを含む、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療方法であり、PCT条約第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。